TOYO GOSEI

Cell-able®

肝細胞スフェロイドアレイ
培養キット

～培養方法～

ご注意：

本キットは研究用として開発されたものです。ヒトまたは動物への適用および臨床診断への使用はできませんのでご注意ください。

ご使用の前に本説明書を必ずお読みください。

１．はじめに

当キットを用いることにより、肝細胞をスフェロイド化した状態で培養することが可能となります。これにより、肝細胞の機能を維持したまま、長期にわたり培養することが期待できます。

（使用する肝細胞の状態などにより、培養状態、実験結果は変動する可能性があり、弊社では保証いたしませんので予めご了承ください）

操作時は実験着、使い捨て手袋、実験用ゴーグル等をご使用ください。

２．キット内容

・培養用パターンプレート

96 ウェルパターンプレート又は 12 ウェルパターンプレート又は 24 ウェルプレート　１枚

・培地(RM-101)　　肝細胞スフェロイド培養用培地　　１本

・取扱説明書（本書）

３．ご準備いただく細胞

・フィーダー細胞（プレート１枚につき約 1×10^6 個）

3T3-Swiss albino　マウス線維芽細胞（推奨：JCRB9019*）

* JCRB 細胞バンク　ホームページにてご確認ください。

：http://cellbank.nibio.go.jp/

・初代肝細胞（プレート１枚につき約 3×10^6 個）

生細胞率が 80%以上を推奨いたします。

４．ご準備いただく装置･器具

（装置）

- CO_2 インキュベータ
- クリーンベンチ
- 遠心機

（器具）滅菌品をお使いください。

- 培養用シャーレ、フラスコなど（フィーダー細胞培養用）
- Cell-able® plate

そのほか必要に応じてピペット、マイクロピペット（チップ）、遠心管などをご用意ください。

5．ご準備いただく試薬　（培養用グレードをお使いください）

・PBS(－)

・トリプシン EDTA（通常使用の 2 倍濃度）

例）GIBCO　15400-054　Trypsin-EDTA（×10)を PBS（－）にて 5 倍希釈したもの（×2 濃度)。

原液を小分け分注・凍結保存し、使用時に 5 倍に希釈調製したものをお勧めします。

・フィーダー細胞培養用培地*

*巻末の「フィーダー細胞継代方法」をご参照ください。

・肝細胞スフェロイド培養用培地（RM-101）

6．キット保存条件

・培養用パターンプレート　；4℃保存

・培地　　；－80℃保存、融解後は 4℃保存し 2 週間以内にお使いください。

7．操作方法

以下の操作は、クリーンベンチ内で行ってください。

（1）フィーダー細胞の準備

フィーダー細胞をパターンプレートに播種する約 1 週間前に、フィーダー細胞を凍結から起こします*。フィーダー細胞培養用培地にて培養を行い、セミコンフレント状態にします。パターンプレート 1 枚に約 1×10^6 個の細胞が必要です。

*フィーダー細胞入手時の添付文書または巻末の「フィーダー細胞継代方法」をご参照ください。

（2）フィーダー細胞の播種

肝細胞播種の 1 日～1 週間前にフィーダー細胞の播種を行います。

・操作方法

①（1）で準備したフィーダー細胞を培養したシャーレの培地を取り除き、PBS（－）で 2 回洗います。

②トリプシン EDTA 溶液（2×濃度）2～3ml をシャーレに加え、37℃のインキュベータ内で 5 分間静置します。

③フィーダー細胞培養用培地 2ml をシャーレに加え、ピペッティングにて細胞をばらばらにし、遠心管に移します。

④160× g 3 分間遠心し、上清を吸引除去してください。

⑤適当量（5ml 程度）のフィーダー細胞培養用培地を加え、ピペッティングにて細胞をばらばらにした後、細胞数を計測します。（図 1 参照）

⑥細胞濃度が 8×10^4 個/ml となるように、必要量のフィーダー細胞培養用培地で希釈します。（96 ウェルプレート：10ml／枚、12 又は 24 ウェルプレート：12ml／枚）

⑦⑥の細胞浮遊液を細胞が均一になるように注意しながら、培養用パターンプレート各ウェルに播種してください。（特に 12 ウェルプレートでは細胞が沈降してしまうと偏りが生じやすいので、播種後はすぐに CO2 インキュベータへ移してください）

（96 ウェルプレート：100μl/well、24 ウェルプレート：500μl/well, 12 ウェルプレート：1000μl/well）

⑧CO_2インキュベータ内にて培養を開始します。フィーダー細胞播種後 24 時間は振動・衝撃を与えないよう、静置してください。

フィーダー細胞を播種した翌日にはパターン上にフィーダー細胞が観察できます。（図 2 参照）

1 日間以上（～1 週間目**まで使用可能）培養後、肝細胞の播種を行います。

**長期間培養される場合は、適宜培地交換を行ってください。

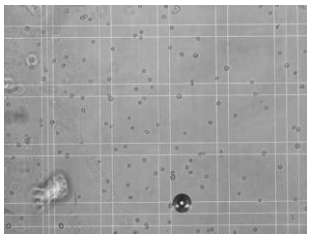

図１　⑤処理後の顕微鏡写真
（血球計算盤 Burker-Turk を使用）

図２　3T3 播種２４時間後の
顕微鏡写真

（３）肝細胞の播種

フィーダー細胞播種後 1 日から 1 週間目までの間に肝細胞を播種します。

操作方法

①生存率 80%以上（推奨）の肝細胞を用意します

（パターンプレート 1 枚に約 3×10^6 個の肝細胞が必要です）

②スフェロイド培養用培地にて肝細胞を 2×10^5 個／ml*となるように希釈し、必要量の肝細胞浮遊液を調製します。（96 ウェルパターンプレート：10ml、24 ウェル・12 ウェルパターンプレート：12ml）

（細胞塊が多いとスフェロイドがうまく形成されないことがありますので、細胞は十分に分散させてください）

③フィーダー細胞を播種して 1 日以上（～1 週間）培養したプレートから培養上清を除去し、②の肝細胞浮遊液を細胞が均一になるように注意しながら播種します。

（96 ウェルプレート：100μl/well、24 ウェルプレート：500μl/well, 12 ウェルプレート：1000μl/well、384 ウェルプレート：25μl/well）

*凍結肝細胞は、ロットにより接着し難いものがあります。その場合、4×10^5 個/ml 程度まで細胞を濃く播種することにより良好なスフェロイド形成が得られることがあります。

（4×10^4 個/well/ 96well plate、1×10^4 個/well/24well plate、4×10^5 個/well/ 12well plate, 5,000 個/well/384well plate）

④CO_2 インキュベータ内にて培養を開始します。

（12 ウェルプレートは細胞が偏りやすいので、細胞を分散させてから静置してください。）

⑤播種後 48 時間は、振動・衝撃を与えないよう、静置してください。

肝細胞播種後、2 日目に培地交換を行ってください。その後は 1～2 日おきに培地交換を行ってください。

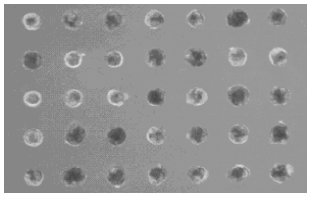

図３　肝細胞播種５日目の顕微鏡写真

培地交換日程例

月曜日	火曜日	水曜日	木曜日	金曜日	土曜日	日曜日	月曜日
交換	-----	交換	-----	交換	-----	-----	交換

培地交換時のご注意

肝細胞播種後、数日はスフェロイドの凝集が弱いため、強い衝撃により細胞がパターンプレートから剥離してしまうことがございます。培地交換の際には、ピペットなどの先端がウェルの底面に触れないように注意しながら、なるべくゆっくり培地を除去し、静かに新しい培地を加えてください。また、培地交換の際には古い培地を３割程度残し、細胞の乾燥を避けるようご注意ください。

分析に際して

肝細胞播種後 48 時間は静置が必要となりますので、48 時間目以降に分析を開始されることを推奨いたします。なお、測定項目によって、経時的に活性が変動する場合がありますので、測定に際しては経時変化を測定して、適切な時期に測定されることを推奨いたします。

廃棄など

実験に使用したプレート、チップなどは、オートクレーブ滅菌を行った後、各自治体の決まりに従って廃棄してください。

本キットご使用に当たっての注意事項

- 本キットは研究用にのみ使用できます。ヒト、動物への適用や臨床診断への転用はできません。
- 本キットの使用によって生じた事故あるいは損害について、弊社は一切の責任を負いませんのでご了承の上ご使用ください。

販売元　東洋合成工業株式会社

東京都台東区浅草橋一丁目 22 番 16 号ヒューリック浅草橋ビル 8 階

Tel;03-6891-4982　Fax;03-6891-4980 e-mail; cell-able@toyogosei.co.jp

参考資料

フィーダー細胞継代方法

準備するもの（器具は全て滅菌してあるものを使用）

凍結フィーダー細胞

遠心管

PBS(-)

基本培地（10%FBS DMEM）

トリプシン EDTA 溶液*

培養用プラスチックシャーレ又は培養用フラスコ

5ml, 10ml ロングピペットなど

1. 凍結細胞融解方法

①遠心チューブに基本培地 5～10ml を取り置く

②凍結細胞が入っているクライオチューブを 37℃に暖めたウオーターバスで融解

（2 分以内）

③融解確認後直ちにクライオチューブ内容物を全て①で準備した培地に移す

④160×g で 3 分間遠心分離後上清を除去する

⑤基本培地に再分散し、シャーレにて培養を行う

（細胞数が少ない場合は 3ml 程度の培地で小さめのシャーレに播種する）

⑥培養条件は CO_2 濃度 5%、37℃、飽和湿度条件とする

2. 培地交換

培地交換は 2～3 日おきとし、培養上清を除去し、新しい基本培地を添加する。

3. Expand 方法

①トリプシン EDTA　PBS(-)で１０倍希釈し、トリプシン溶液とする

②新しいシャーレ　5～10 枚に基本培地を入れておく（1/5～1/10 にスプリット）

③セミコンフレント状態の培養フラスコの培養上清を全て除去する

④PBS(-)2～3ml にて 2 回洗浄する

⑤トリプシン溶液 2～3ml を添加し、CO_2インキュベータ内にて 3～5 分間放置

⑥基本培地を 2ml 程度加え反応を停止後、細胞をピペッティングにて十分剥離分散させ、

内容物を 15ml の遠心チューブに移す

⑦160×g で 3 分間遠心分離後上清を除去する

⑧適当量の基本培地を加え細胞を再分散後、②で用意したフラスコに分注する

この際、各シャーレ内の細胞が均一に分散するように注意すること

⑨1．2．と同じ条件で培養を行う

*トリプシン EDTA 例　GIBCO15400　（×10 濃度）

Expand 用　PBS にて 10 倍希釈

Cell-able®　播種用　PBS にて 5 倍希釈